

CLONACIÓN, CÉLULAS MADRE Y REPROGRAMACIÓN CELULAR
Universidad Católica de Valencia
San Vicente Mártir
JUSTO AZNAR
DIRECTOR DEL INSTITUTO DE CIENCIAS DE LA VIDA
ABRIL 2010

CLONACIÓN

DEFINICIÓN DE CLONACIÓN

Por clonación se entiende:

- **Producir múltiples copias de una secuencia de ADN mediante técnicas de ADN recombinante**
- **Producir una célula genéticamente idéntica a partir de otra célula**
- **Obtener una población celular con idéntico fenotipo**
- **Producir un ser biológico genéticamente idéntico a otro a partir del material genético de una célula de la persona o animal que se va a clonar**

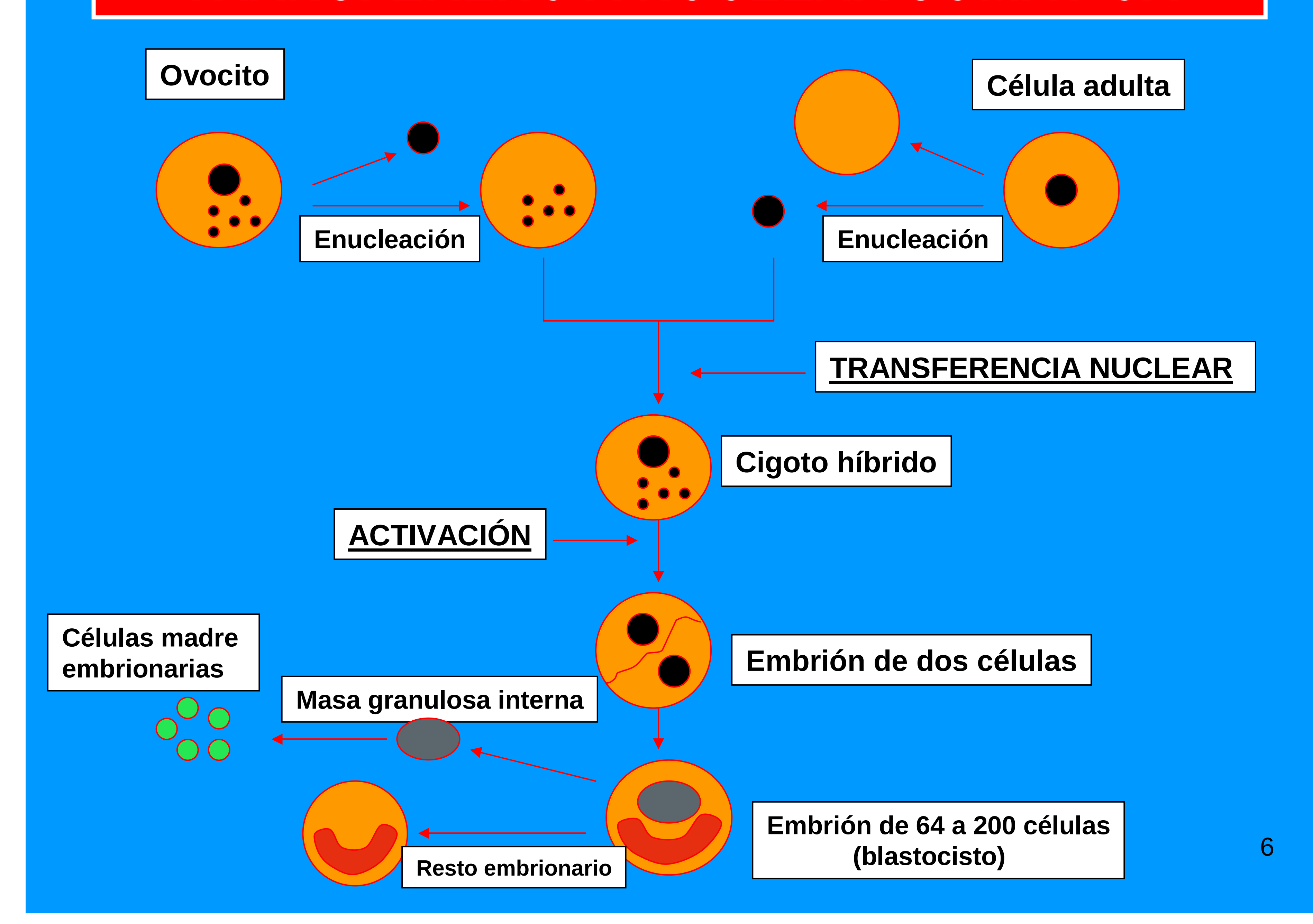
CLONACIÓN

CLONACIÓN ANIMAL

CLONACIÓN HUMANA

HIBRIDACIÓN

¿EN QUE CONSISTE LA CLONACIÓN DE EMBRIONES REALIZADA POR TRANSFERENCIA NUCLEAR SOMÁTICA?


TRANSFERENCIA NUCLEAR SOMÁTICA
Ovocito
Célula adulta
Enucleación
Enucleación
TRANSFERENCIA NUCLEAR
Cigoto híbrido
ACTIVACIÓN
Células madre embrionarias
Embrión de dos células
Masa granulosa interna
Embrión de 64 a 200 células (blastocisto)
Resto embrionario


CLONACIÓN REPRODUCTIVA Y TERAPÉUTICA
Implantación en el
útero de una mujer
embarazo
niño
Blastocisto
Clonación reproductiva
Clonación terapéutica
Células de:
• Hígado
• Corazón
• Músculo
• Nerviosas
• Sangre
• etc.
cultivo
obtención de
células madre
masa granulosa
interna
resto del embrión
que se destruye

¿ES ADECUADO EL TÉRMINO “CLONACIÓN TERAPÉUTICA”? ¿NO SE DEBERÍA LLAMAR “CLONACIÓN EXPERIMENTAL”?

CLONACIÓN ANIMAL

CLONACIÓN ANIMAL

RESUMEN HISTÓRICO

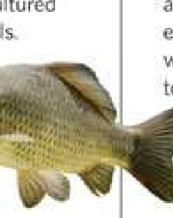
1952

Robert Briggs and Thomas King in Philadelphia, Pennsylvania, describe how they cloned frogs (*Rana pipiens*) by replacing the nuclei of eggs with cells from tadpoles and adult intestinal epithelium. A similar experiment was first proposed by Hans Spemann at the University of Freiberg, Germany, in 1938.

1984



Chinese researchers clone a fish — the crucian carp (*Carassius carassius*) — from cultured kidney cells.



1996

Researchers at the Roslin Institute in Scotland clone two lambs — Megan and Morag — from embryonic cells. This was a crucial step towards cloning an animal from an adult cell, and is seen by some scientists as a bigger breakthrough than Dolly herself.

1997

Roslin researchers announce the birth of Dolly the sheep, the first mammal to be cloned from an adult cell, igniting public debate about the prospects for cloning humans.

1998

Scientists at the University of Hawaii reveal the cloning of three generations of mice from the nuclei of adult cells, suggesting the technique could work on other mammals.

1998

Japanese researchers report cloning eight calves using adult cells from slaughterhouse entrails, raising the possibility that animals could be cloned for the quality of their meat.



1998

Scientists in New Zealand announce Elsie, a clone created from an adult cell from the last surviving Enderby Island cow (*Bos gaurus*). Attempts to clone endangered species have met with criticism that the technique will do little good without concurrent habitat preservation.

2000

PPL Therapeutics in Scotland unveils a litter of five cloned piglets. The firm says that genetically engineered cloned pigs could one day provide a source of organ transplants for humans.



2002

The first cloned cat (*Felis domesticus*), named cc for 'copycat', is announced by Texas A&M researchers. Cc's coat pattern is not the same as her genetic donor's, showing the impact on development of non-genetic effects.

2003

Italian scientists at the Laboratory of Reproductive Technology in Cremona announce Prometea, the first horse (*Equus caballus*) clone created from a skin cell, raising hopes that clones could one day perpetuate the genetic line of castrated geldings.



2003

French and Chinese scientists unveil Ralph the cloned laboratory rat (*Rattus norvegicus*). Rats had been tough to clone because rat eggs divide before the point at which the donor DNA is injected, so the technique relied on using drugs to inhibit division.

2004

Although Seoul National University researcher Woo Suk Hwang's claim to have derived stem-cell lines from cloned human embryos was later discredited, his group can still boast the most experience, and probably the highest number of cloned human embryos, but there is no hard evidence for this.

2005

Hwang's lab announces Snuppy the cloned dog. Although much of the stem-cell research from this lab has been discredited, Snuppy's clonal credentials have been confirmed.

Heidi Ledford. Nature 445; 800-802, 2007

CLONACIÓN ANIMAL

Clonación de lobos



Investigadores de la Universidad de Seúl publican en marzo de 2007 la clonación de dos lobos, Snuwolf y Snuwolffy

M.K. Kim y col. Cloning and Stem Cells 9; 130-137, 2007

Un equipo de la propia Universidad de Seúl confirma, el 27 de abril de 2007, que los lobos clonados son genuinos clones

Nature / DOI: 10.1038 / News 070430- 4. 1 de mayo de 2007)

CLONACIÓN ANIMAL

Clonación de blastocistos de primates

El equipo de Shoukhrat Mitalipov consiguió por primera vez en el mundo clonar blastocistos de primates a partir de células de piel de macacus rhesus, que fueron transferidas a 304 ovocitos obtenidos de 14 hembras de esta misma raza de monos . Se obtuvieron 21 blastocistos, de los que derivaron 2 líneas de células madre embrionarias

Eficiencia 0.7%

J.A. Byrne y col. Nature 450; 497-502, 2007

¿TIENEN PROBLEMAS LAS ANIMALES CLONADOS?

Prematuro envejecimiento
Desarrollo de malformaciones congénitas
Padecimiento de distintas patologías: reuma, ceguera, sordera, defectos musculares, diabetes y procesos neurodegenerativos

¿TIENE PROBLEMAS LA TÉCNICA?

Baja eficiencia

Para la obtención de la oveja Dolly se realizaron 270 intentos de clonación

Para el galgo afgano se produjeron 1095 embriones, que se transfirieron a 123 perras, llegando a término 2 y sobreviviendo 1

La eficiencia de la clonación de primates es del 0,7% aproximadamente

CLONACIÓN HUMANA

INTENTOS DE CLONACIÓN HUMANA

1. Cibelli JB. J Regener Med 2; 25, 2001[1]
2. Chen Y. Cell Res 13; 251, 2003
3. Guangxin L. Chinese Sci Bull 48; 1240, 2003[1]
4. Hwang WS et al. Science 303; 1669, 2004
5. Hwang WS et al. Science 308; 1777, 2005
6. Stojkovic M et al. Reprod Bio Med Online 11; 226, 2005[1]
7. Zavos P. et al. Archives of Andrology 52; 243, 2006

[1] No consiguieron obtener células madre de los blastocistos clonados

¿SE HABÍA CONSEGUIDO HASTA EL AÑO 2007 LA CLONACIÓN HUMANA?

No parece que hasta ese momento existiera evidencia de que se hubiera logrado la clonación de seres humanos

J. Yu y col. Science 318; 1917-1920, 2006

J. Hanna y col. Science 318; 1920-1923, 2007

T. Kakahashi y col. Cell 131; 861-872, 2007

X Yang y col. Nature Genetics 39; 295-302, 2007

CLONACIÓN HUMANA

Sin embargo, en 2008 un equipo de la firma comercial Stemagen Corporation de la Jolla, California, publicó un artículo en donde afirmaban que habían podido obtener blastocistos humanos por transferencia nuclear somática utilizando células adultas de piel y ovocitos de mujeres jóvenes (20-24 años) sobrantes de fecundación in vitro

También obtuvieron blastocistos a partir de un pequeño número de ovocitos humanos partenogenéticamente

AJ French. Stem Cells 26; 485-493, 2008

HIBRIDACIÓN

HIBRIDACIÓN HOMBRE ANIMAL

JUSTIFICACIÓN

Sustituir los óvulos humanos en el proceso de clonación

HIBRIDACIÓN HOMBRE-ANIMAL TIPOS

HIBRIDACIÓN

Embriones humanos o animales transgénicos **a los que se les ha trasferido algún gen animal**

Quimera **producida a partir de una célula procedente de un embrión animal que se transfiere a un embrión humano**

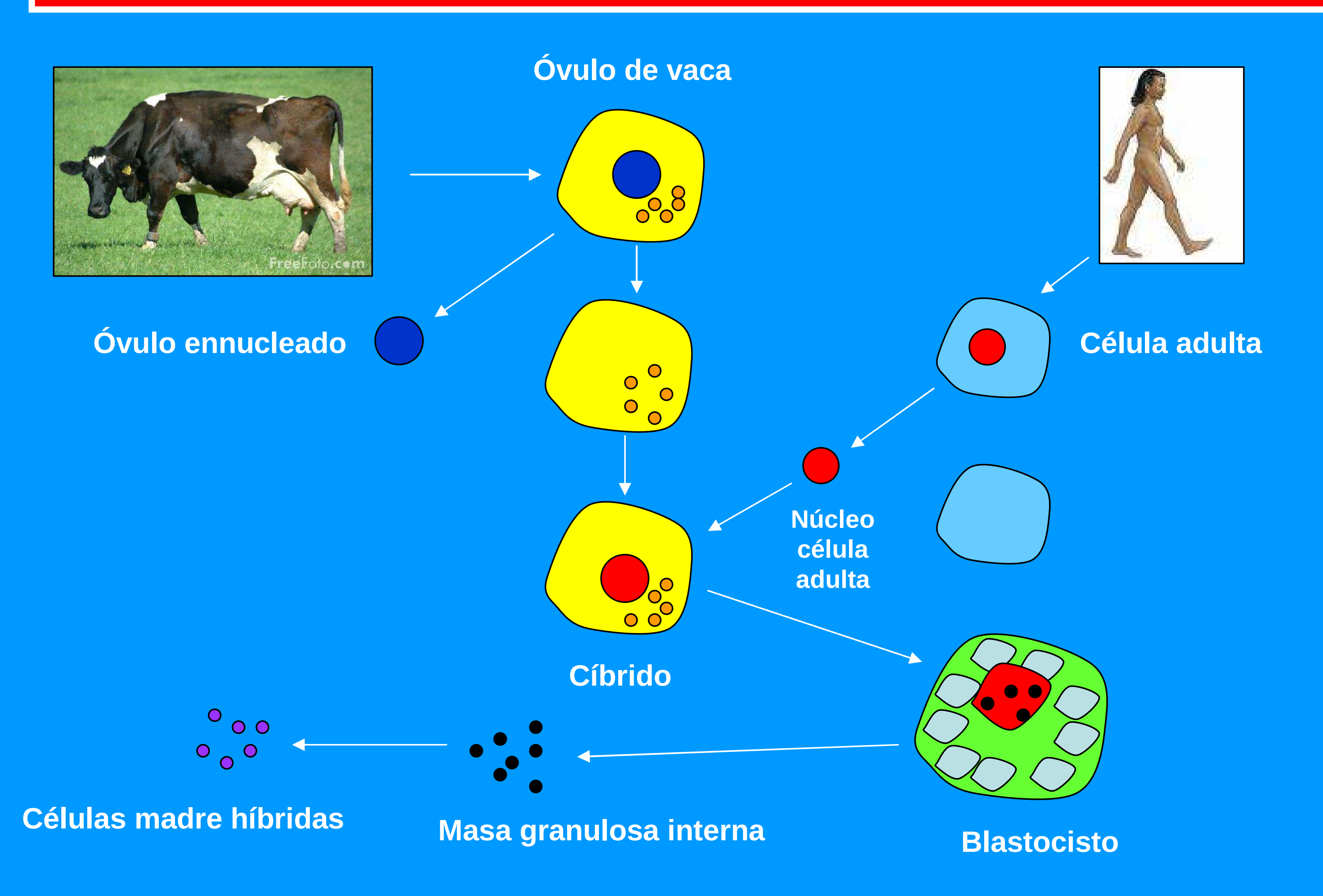
Transferir el núcleo de una célula humana adulta a un óvulo animal enucleado

El 98% del material genético es humano

Algunos lo llaman *cíbrido*

Fertilización de un óvulo humano con esperma animal o viceversa. Son verdaderos *híbridos*

CÍBRIDOS DE HOMBRE Y ANIMAL



HIBRIDACIÓN



¿Podríamos llegar a ser así?

¿ES POSIBLE LA PRODUCCIÓN DE CÍBRIDOS?

Experiencias recientes parecen demostrar que los factores de activación del genoma existentes en el ovocito de los animales no son capaces de activar el genoma humano

Si esto se confirmara no parece que fuera posible la producción de cíbridos entre humano y animal

HIBRIDACIÓN HOMBRE-ANIMAL

RIESGOS

El uso eventual de células troncales extraídas de cíbridos podría implicar riesgos aun desconocidos para la persona que las reciben por la presencia de material genético animal en su citoplasma

Exponer conscientemente a un ser humano a este riesgo es éticamente inaceptable

CÉLULAS MADRE

¿QUE SON LAS CÉLULAS MADRE?

Las células madre, también denominadas células troncales, estaminales o en inglés células stem "son células que tienen la capacidad, no solamente de poder cultivarse y reproducirse a si mismas, sino también de poder producir células adultas de diferente progenie, es decir de diferentes tejidos"

I.L. Weissman. New England Journal of Medicine 346; 1576-1583, 2002

TIPOS DE CÉLULAS MADRE

Pueden ser:

Por su potencialidad

Células

- Totipotentes
- Pluripotentes
- Multipotentes
- Unipotentes

Pueden dar lugar a

- Capaces de formar células de todos los linajes del organismo. En los mamíferos solamente lo son el cigoto y los primeros blastómeros
- Capaces de formar células de todos los linajes del cuerpo, son las denominadas células madre embrionarias.
- Son las células madre adultas capaces de formar distintos tipos de células de un mismo linaje, como las células madre hematopoyéticas
- Son células madre adultas que producen células de un solo linaje, como las células madre germinales, entre ellas las espermatogonias que generan el esperma

Por su origen

- Células madre embrionarias
- Células madre de tejidos adultos

Textos de: R. Jaenisch y R. Young. Cell 132; 567-582, 2008

CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

¿DE DÓNDE SE OBTIENEN LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS?

De embriones

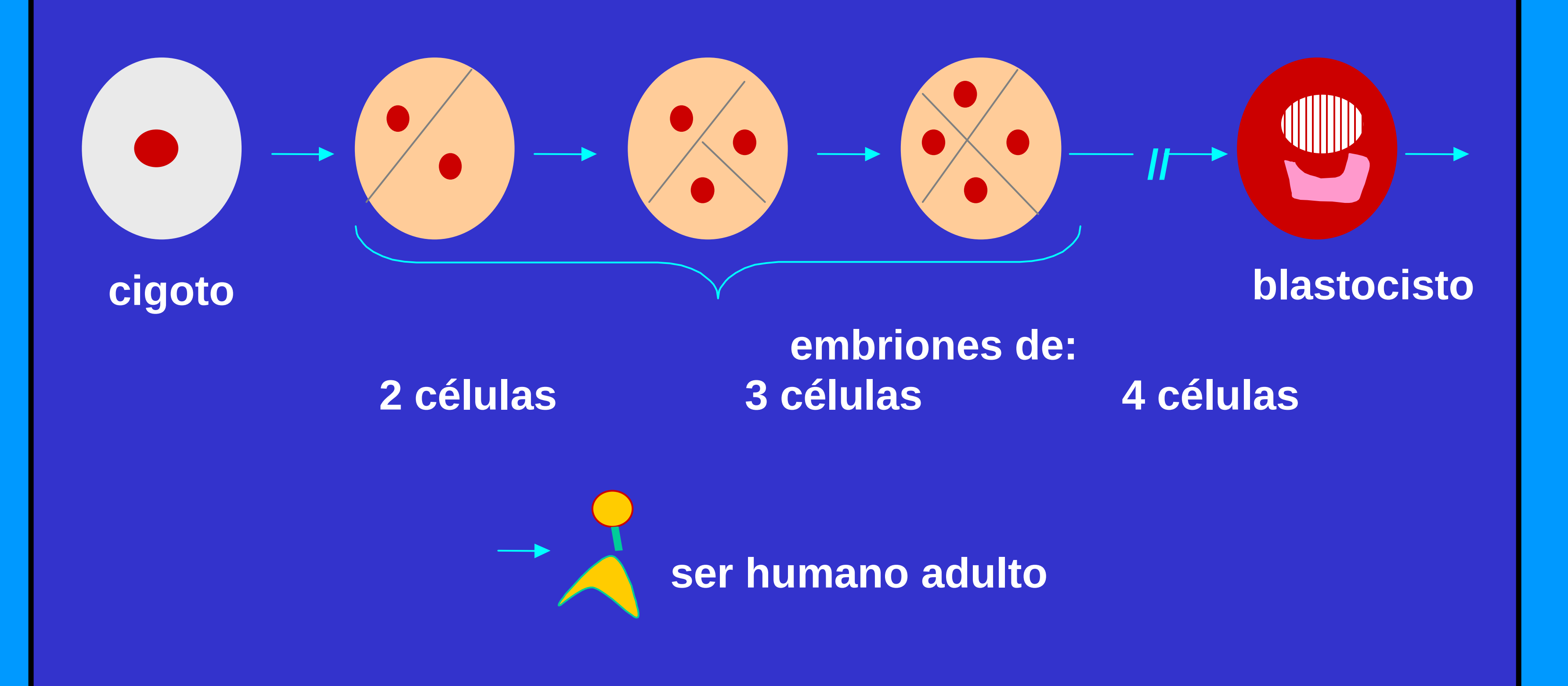
Sobrantes de fecundación in vitro

Producidos por transferencia nuclear somática (clonación)

Generados por partenogénesis a partir de ovocitos animales o humanos

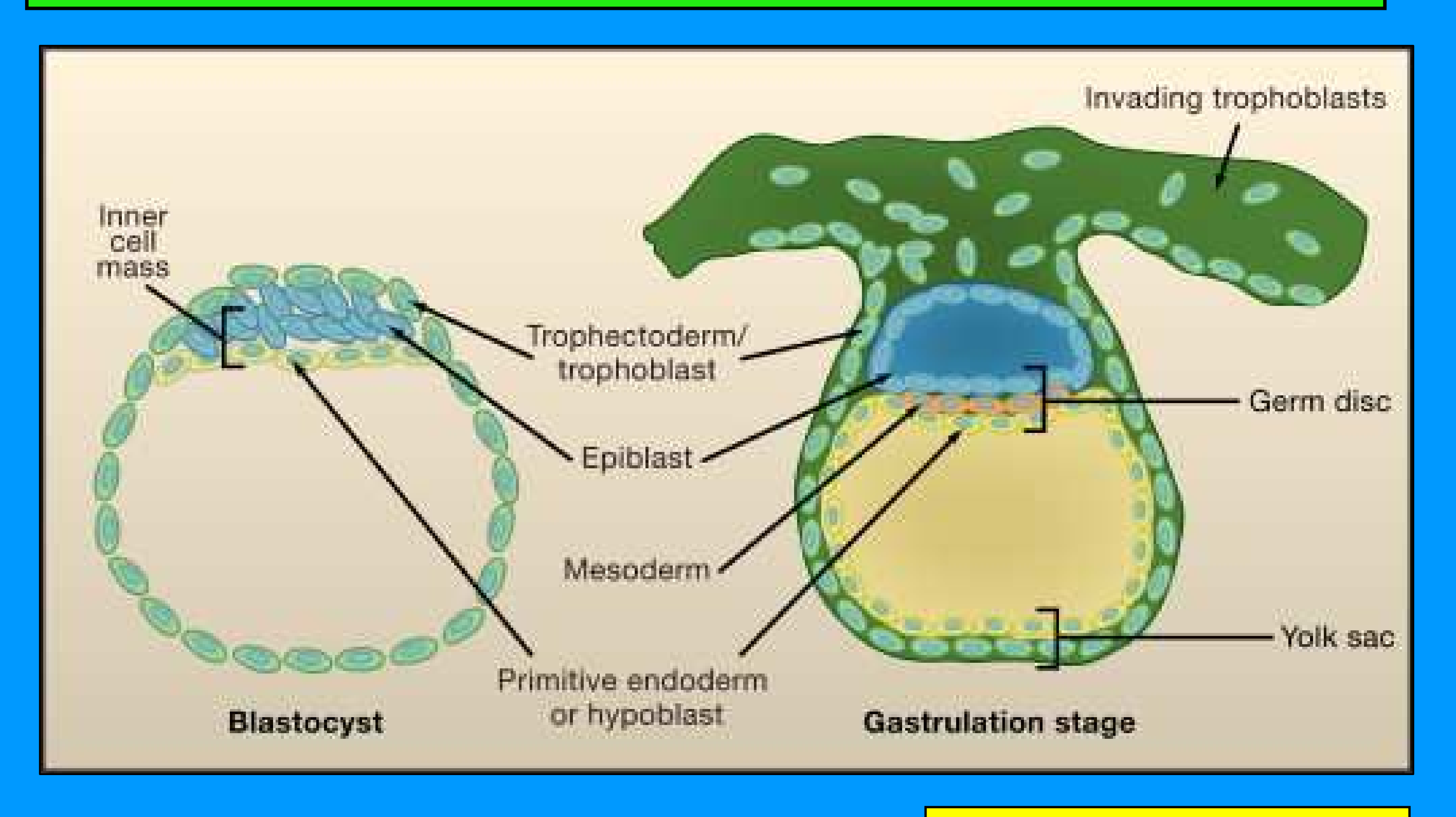
FUNDAMENTO DE LA POLÉMICA ÉTICA

Porque para obtenerlas hay que destruir ineludiblemente un embrión humano


DESARROLLO EMBRIONARIO
cigoto
blastocisto
embriones de:
2 células
3 células
4 células
ser humano adulto

DESARROLLO EMBRIONARIO

CONSTITUCIÓN DE LA MASA CELULAR INTERNA



J. Rossant
Cell 132, 527-531, 2008

¿POR QUÉ LA UTILIZACIÓN DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS SUSCITA UNA POLÉMICA SOCIAL TAN VIVA?

Porque su uso puede ser importante para diversos estudios biomédicos, especialmente para el mejor conocimiento de las primeras etapas del desarrollo del embrión humano

Por sus hipotéticas aplicaciones terapéuticas de cara a la medicina regenerativa y reparadora

Por los importantes problemas éticos que su utilización conlleva

Incluso, por la posibilidad de rentabilizar económicamente su uso

POTENCIAL TERAPÉUTICO DE LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS. PRIMERAS EXPERIENCIAS

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS HUMANAS

En 2007 se demostró por primera vez que cardiomiocitos generados a partir de células madre embrionarias humanas podían mejorar la función cardiaca de corazones de rata infartados

M.A. Laflamme y col.
Nature Biotechnology 25; 1015 – 1024, 2007

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS. PRIMERAS EXPERIENCIAS

En 2008 se comprobó que a partir de células madre embrionarias se podían obtener células de músculo esquelético y que cuando éstas se transferían a ratones con distrofia muscular se lograba mejorar la función muscular sin que se produjeran teratomas

Estas experiencias sugieren la posibilidad de aplicarlas en pacientes con distrofia muscular, particularmente en la distrofia muscular de Duchenne

R Darabi y col. Nature Medicine 14; 134-143, 2008

ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS MADRE


EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON
CÉLULAS MADRE
EMBRIONARIAS

ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS MADRE

Total de ensayos clínicos…………………………….83885
Número de países en que se han realizado………….171
Ensayos clínicos con células madre..……………….…..2446
Ensayos clínicos con células madre adultas………2392
Ensayos clínicos con células de sangre de cordón umbilical…………………………………………………….144
Ensayos clínicos con células madre embrionarias….10

Clinical Trials.gov
(fecha de consulta 15-5-2010)

ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

RANK	STATUS	STUDY
1	Recruiting	The Derivation of Human Embryonic Stem Cell Lines From PGD Embryos
2	Recruiting	Derivation of New Human Embryonic Stem Cell Lines Lines for Clinical Use
3	Active, not recruiting	The Role of TBX3 in Human ES Cell Differentiation
4	Recruiting	Studying Breast Stem Cells From Patients With Cancer and From Healthy Individuals
5	Recruiting	Patient Specific Induced Pluripotency Stem Cells (PSiPS)
6	Recruiting	Isolation and Characterization of Mammary Stem Cells
7	Recruiting	The Transendocardial Autologous Cells (hMSC or hBMC) in Ischemic Heart Failure Trial (TAC-HFT)
8	Recruiting	Evaluation of Circulating Levels of Adult Stem Cells in the Peripheral Blood of Patients With Acute Decompensated Heart Failure and Following Stabilization, in Comparison With Healthy Volunteers (CIRCSTEM-HF)
9	Active, not recruiting	Development of iPS From Donated Somatic Cells of Patients With Neurological Diseases
10	Recruiting	Molecular Characterization of Neuroblastic Tumor: Correlation With Clinical Outcome

Clinical Trials.gov (fecha de consulta 15/5/2010)

ESTUDIOS REALIZADOS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

	TEMA DEL ENSAYO	CENTRO DONDE SE REALIZA	OBJETO DE LA INVESTIGACIÓN	¿ESTÁ DIRECTAMENTE DIRIGIDO A CURAR A ENFERMOS?
1	The derivation of human embryonic stem cell lines from PGD embryos	Hadassah Medical Organization (Jerusalem)	Crear embriones que padecen una enfermedad para derivar de ellos líneas celulares	No
2	Derivation of new human embryonic stem cell lines for clinical use.	Hadassah Medical Organization (Jerusalem)	To derive several new hESC lines that will be suitable for clinical trials.	No
3	Studying breast stem cells from patients with cancer and from healthy individuals.	National Cancer Institute (NCL) (Maryland)	This research study is looking at breast stem cells from patients with cancer and from healthy individuals	No
4	The role of TBX3 in human ES cell differentiation	University of California (Irvine)	They propose a novel approach to understanding differentiation of human embryo stem.	No

Clinical Trials.gov
(fecha de consulta 15/5/2010)

ESTUDIOS REALIZADOS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

5	Isolation and characterization of mammary stem cells	National Cancer Institute (NCL) (Maryland)	To isolate tumor stem cells using the same methods generally used to isolate human embryonic stem cells.	No
6	Evaluation of circulating levels of adult stem cells in the peripheral blood of patients with acute decompensated heart failure and following stabilization in comparison with healthy volunteers	Monash University (Melbourne)	Seeks to examine the levels of a number of different types of stem cells in patients with heart failure, compared to healthy volunteers	No
7	The transendocardial autologous cells (hMSC or hBMC) in ischemic heart failure trial (TAC-HFT)	University of Miami (Miami)	No utilizan células madre embrionarias, sino células mesenquimal (de médula ósea ontológica)	No
8	Molecular characterization of neublastic tumor: correlation with clinical outcome	Memorial Sloan-Kettering Cancer Center	To find out the genetic and biochemical makeup of your neuroplastic tumor	No

Clinical Trials.gov
(fecha de consulta 15/5/2010)





Check the Score: Adult Stem Cells vs. Embryonic Stem Cells
Benefits in Human Patients (*from Peer-Reviewed Studies*)

Adult Stem Cells		Embryonic Stem Cells
Cancers: 1. Brain Cancer 2. Retinoblastoma 3. Ovarian Cancer 4. Skin Cancer: Merkel Cell Carcinoma 5. Testicular Cancer 6. Tumors Abdominal Organs Lymphoma 7. Non-Hodgkin's Lymphoma 8. Hodgkin's Lymphoma 9. Acute Lymphoblastic Leukemia 10. Acute Myelogenous Leukemia 11. Chronic Myelogenous Leukemia 12. Juvenile Myelomonocytic Leukemia 13. Chronic Myelomonocytic Leukemia 14. Cancer Of The Lymph Nodes: Angioimmunoblastic Lymphadenopathy 15. Multiple Myeloma 16. Myelodysplasia 17. Breast Cancer 18. Neuroblastoma 19. Renal Cell Carcinoma 20. Soft Tissue Sarcoma 21. Various Solid Tumors 22. Ewing's Sarcoma 23. Waldenstrom's Macroglobulinemia 24. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis 25. Poems Syndrome 26. Myelofibrosis **Auto-Immune Diseases:** 27. Diabetes Type I (Juvenile) 28. Systemic Lupus 29. Sjogren's Syndrome 30. Myasthenia 31. Autoimmune Cytopenia 32. Scleromyxedema 33. Scleroderma 34. Crohn's Disease 35. Behcet's Disease 36. Rheumatoid Arthritis 37. Juvenile Arthritis 38. Multiple Sclerosis 39. Polychondritis 40. Systemic Vasculitis 41. Alopecia Universalis 42. Buerger's Disease	**Cardiovascular:** 43. Acute Heart Damage 44. Chronic Coronary Artery Disease **Ocular:** 45. Corneal Regeneration **Immunodeficiencies:** 46. Severe Combined Immunodeficiency Syndrome 47. X-Linked Lymphoproliferative Syndrome 48. X-Linked Hyper Immunoglobulin M Syndrome **Neural Degenerative Diseases And Injuries:** 49. Parkinson's Disease 50. Spinal Cord Injury 51. Stroke Damage **Anemias And Other Blood Conditions:** 52. Sickle Cell Anemia 53. Sideroblastic Anemia 54. Aplastic Anemia 55. Red Cell Aplasia 56. Amegakaryocytic Thrombocytopenia 57. Thalassemia 58. Primary Amyloidosis 59. Diamond Blackfan Anemia 60. Fanconi's Anemia 61. Chronic Epstein-Barr Infection **Wounds And Injuries:** 62. Limb Gangrene 63. Surface Wound Healing 64. Jawbone Replacement 65. Skull Bone Repair **Other Metabolic Disorders:** 66. Hurler's Syndrome 67. Osteogenesis Imperfecta 68. Krabbe Leukodystrophy 69. Osteopetrosis 70. Cerebral X-Linked Adrenoleukodystrophy **Liver Disease** 71. Chronic Liver Failure 72. Liver Cirrhosis **Bladder Disease** 73. End-Stage Bladder Disease	--- **Updated 14/04/2007**

For references see http://www.stemcellresearch.org/facts/asc-refs.pdf

1100 H St. NW • Suite 700 • Washington, DC 20005 • PH: 202-347-6840 • FX: 202-347-6849
http://www.stemcellresearch.org

NUEVAS PROPUESTAS PARA LA UTILIZACIÓN CLÍNICA CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

La compañía Geron ha propuesto realizar experiencias clínicas con células madre embrionarias para el tratamiento de lesiones de la médula espinal

También Novocell ha propuesto generar células productoras de insulina a partir de células madre embrionarias

Igualmente Mytogen quiere desarrollar células epiteliales pigmentadas de retina para tratar a pacientes con degeneración macular

Nature Biotechnology 26, 598-599, 2008

LA FDA DENIEGA LA AUTORIZACIÓN PARA REALIZAR ESTAS EXPERIENCIAS

Las tres propuestas fueron denegadas por la FDA norteamericana, objetando que antes de pasar a realizar en humanos los ensayos clínicos anteriormente referidos había que cumplimentar rigurosos controles de seguridad y llevar a cabo las pertinentes experiencias en animales

Nature Biotechnology 26, 598-599, 2008

PRIMERAS EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Sin embargo, sorpresivamente el 23 de enero de 2009 la propia FDA, a propuesta de la firma Geron, aprobó la realización de un ensayo clínico de fase 1 con células madre embrionarias dirigido a tratar pacientes con lesión de médula espinal

Las experiencias se realizarían en 8 a 12 pacientes que hubieran sufrido una lesión grave de médula espinal durante las 2 semanas anteriores

Para ser incluidos en el estudio los pacientes tendrían que recibir un tratamiento inmunodepresor durante 46 días

Nature Biotechnology 2009; 27: 213-214

PRIMERAS EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Los resultados del ensayo promovido por Geron no se conocerán hasta finales de 2010 o principios de 2011

PRIMERAS EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Posteriormente se ha propuesto un segundo ensayo en el que se pretende crear a partir de células madre embrionarias un tejido similar al destruido en pacientes con degeneración macular asociada a la edad; las células creadas se colocarán sobre una membrana artificial que posteriormente se insertará en la mácula

En primer lugar se realizará un pequeño ensayo piloto con una docena de pacientes que se llevará a cabo entre 2010 y 2012

Herderson M.

Times Online 24 de abril 2009

PRIMERAS EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Posteriormente otras compañías como Neuralstem, Biotime, ACT y Stem Cells han propuesto iniciar también trabajos con células madre embrionarias

Nature Biotechnology 27; 241, 2009

PRIMERAS EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Naturalmente la aprobación de estas experiencias abre la puerta a otras similares y así otra compañía, Mryland. Concretamente Neuralstem ha propuesto desea iniciar experiencias para el tratamiento de la esclerosis lateral amiotrófica y Stem Cells Inc para tratar la enfermedad de Peliazeus-Merzbacher, una enfermedad neurológica infantil que generalmente lleva a la muerte de estos pacientes

EXPECTATIVAS TERAPÉUTICAS UTILIZANDO CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

El escaso número de experiencias clínicas con células madre embrionarias se ha debido a la ineficiencia del proceso de clonación, la falta de conocimiento de los mecanismos que regulan estos procesos, la necesidad de mantener terapia inmunosupresiva durante toda la vida, el riesgo de inducir el desarrollo de teratomas y finalmente por las dificultades éticas que su uso conlleva

PRIMERAS EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Sin embargo, importantes investigadores con concretamente James Thomson y John Gearhart, creen que "existe una gran preocupación entre muchos de nosotros ante la posibilidad de que algunos de los pacientes incluidos en el estudio puedan desarrollar tumores lo que podría ser un auténtico desastre"

Nature Biotechnology 2009; 27: 213-214

PRIMERAS EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

En este sentido en febrero de 2009, un niño israelí que padecía una ataxia telangiectasia y que había recibido varios trasplantes de células madre neurales fetales desarrolló teratomas en el cerebro y medula espinal cuatro años después de iniciado el tratamiento

PLoS Med 6; e1000029

EXPECTATIVAS TERAPÉUTICAS UTILIZANDO CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

“Nadie podría prometer hoy la falsedad de que con células madre embrionarias se puede curar a alguien inminentemente, esto es engañar cruelmente a pacientes y público”

M. Enserink. Science 313; 160-163, 2006


CÉLULAS
MADRE DE
TEJIDOS
ADULTOS

¿DE DONDE SE OBTIENEN LAS CÉLULAS MADRE DE TEJIDOS ADULTOS?

Diferentes tejidos adultos

Cordón umbilical

Placenta

De células madre germinales obtenidas de fetos abortados

Teratocarcinomas o carcinomas embrionarios, especialmente de tumores testiculares

MECANISMOS POR LOS CUALES EJERCEN SU FUNCIÓN LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

Fusionándose con las células del órgano lesionado
Diferenciándose a células específicas de ese órgano

Favoreciendo la vasculogénesis a partir de células progenitoras endoteliales contenidas en el material celular o de células mononucleares de la médula ósea

Ejerciendo acciones paracrinas por liberación de factores de crecimiento, proteínas angiogénicas, factores tróficos o factores moduladores del sistema inmunológico

Remodelando físicamente la arquitectura tridimensional del órgano afectado

Estos mecanismos in vivo no parecen relevantes


EXPERIENCIAS CLÍNICAS CON
CÉLULAS MADRE ADULTAS

EXPECTATIVAS CLÍNICAS DERIVADAS DEL USO DE CÉLULAS MADRE DE TEJIDOS ADULTOS

“Seguramente no hay un precedente así en la ciencia actual”

J. Martin. The Lancet 365; 2070-2071, 2005

CÉLULAS MADRE ADULTAS
RESUMEN HISTÓRICO

En 1992, se publicaron las primeras experiencias demostrando que las células madre de tejidos adultos se podían diferenciar en células de su mismo tejido celular, es decir, se comprobó que mostraban más plasticidad de lo que hasta ese momento se creía

Proc Natl Acad Sci 89; 850, 1992
Science 255; 1717, 1992

CÉLULAS MADRE ADULTAS
RESUMEN HISTÓRICO

Más tarde se confirmó su plasticidad y se demostró que podían transformarse en células multipotentes

Proc Natl Acad Sci 94; 4080, 1997

CÉLULAS MADRE ADULTAS
RESUMEN HISTÓRICO

Células madre mesenquinales de médula ósea se pueden transformar en células de corazón, hueso, cartílago, grasa y endotelio

Reyes y col
Blood 98; 2615, 2001

CÉLULAS MADRE ADULTAS
RESUMEN HISTÓRICO

Se demuestra, por primera vez, que las células cardiacas lesionadas pueden regenerarse así mismas. Hasta ahora se creía que esto solamente podían hacerlo las células madre de médula ósea, hígado o intestino

N Engl J Med 346; 5, 2002

CÉLULAS MADRE ADULTAS
RESUMEN HISTÓRICO

Junto a estas experiencias, otras muchas, han confirmado la posibilidad de obtener células de distintos tejidos a partir de células madre del propio tejido o de otro diferente

De todo lo anterior se deduce que, al menos las células madre de tejido adulto pueden ser una alternativa real a las células madre embrionarias para su utilización en la medicina regenerativa y reparadora

ENSAYOS CLÍNICOS REALIZADOS

ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS MADRE ADULTAS APROBADOS POR LA FDA

En enero de 2007 había

1238

ensayos clínicos aprobados por la Food and Drug Administration norteamericana

De ellos, más de 250 en infarto de miocardio, 24 en linfoma de tipo no-Hodgkin y 5 en tumores testiculares

A. D. Prentice y G. Tarne
Science 315; 328,2007

ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS MADRE

Total de ensayos clínicos……………………………..83885
Número de países en que se han realizado………….171
Ensayos clínicos con células madre...………………...2446
Ensayos clínicos con células madre adultas………2392
Ensayos clínicos con células de sangre de cordón umbilical……………………………………………….144
Ensayos clínicos con células madre embrionarias….10

Clinical Trials.gov
(fecha de consulta 15-5-2010)





Check the Score: Adult Stem Cells vs. Embryonic Stem Cells
Benefits in Human Patients (*from Peer-Reviewed Studies*)

Adult Stem Cells

Cancers:
1. Brain Cancer
2. Retinoblastoma
3. Ovarian Cancer
4. Skin Cancer: Merkel Cell Carcinoma
5. Testicular Cancer
6. Tumors Abdominal Organs Lymphoma
7. Non-Hodgkin's Lymphoma
8. Hodgkin's Lymphoma
9. Acute Lymphoblastic Leukemia
10. Acute Myelogenous Leukemia
11. Chronic Myelogenous Leukemia
12. Juvenile Myelomonocytic Leukemia
13. Chronic Myelomonocytic Leukemia
14. Cancer Of The Lymph Nodes: Angioimmunoblastic Lymphadenopathy
15. Multiple Myeloma
16. Myelodysplasia
17. Breast Cancer
18. Neuroblastoma
19. Renal Cell Carcinoma
20. Soft Tissue Sarcoma
21. Various Solid Tumors
22. Ewing's Sarcoma
23. Waldenstrom's Macroglobulinemia
24. Hemophagocytic Lymphohistiocytosis
25. Poems Syndrome
26. Myelofibrosis

Auto-Immune Diseases:
27. Diabetes Type I (Juvenile)
28. Systemic Lupus
29. Sjogren's Syndrome
30. Myasthenia
31. Autoimmune Cytopenia
32. Scleromyxedema
33. Scleroderma
34. Crohn's Disease
35. Behcet's Disease
36. Rheumatoid Arthritis
37. Juvenile Arthritis
38. Multiple Sclerosis
39. Polychondritis
40. Systemic Vasculitis
41. Alopecia Universalis
42. Buerger's Disease

Cardiovascular:
43. Acute Heart Damage
44. Chronic Coronary Artery Disease

Ocular:
45. Corneal Regeneration

Immunodeficiencies:
46. Severe Combined Immunodeficiency Syndrome
47. X-Linked Lymphoproliferative Syndrome
48. X-Linked Hyper Immunoglobulin M Syndrome

Neural Degenerative Diseases And Injuries:
49. Parkinson's Disease
50. Spinal Cord Injury
51. Stroke Damage

Anemias And Other Blood Conditions:
52. Sickle Cell Anemia
53. Sideroblastic Anemia
54. Aplastic Anemia
55. Red Cell Aplasia
56. Amegakaryocytic Thrombocytopenia
57. Thalassemia
58. Primary Amyloidosis
59. Diamond Blackfan Anemia
60. Fanconi's Anemia
61. Chronic Epstein-Barr Infection

Wounds And Injuries:
62. Limb Gangrene
63. Surface Wound Healing
64. Jawbone Replacement
65. Skull Bone Repair

Other Metabolic Disorders:
66. Hurler's Syndrome
67. Osteogenesis Imperfecta
68. Krabbe Leukodystrophy
69. Osteopetrosis
70. Cerebral X-Linked Adrenoleukodystrophy

Liver Disease
71. Chronic Liver Failure
72. Liver Cirrhosis

Bladder Disease
73. End-Stage Bladder Disease

Embryonic Stem Cells

Updated 14/04/2007

For references see http://www.stemcellresearch.org/facts/asc-refs.pdf

1100 H St. NW • Suite 700 • Washington, DC 20005 • PH: 202-347-6840 • FX: 202-347-6849
http://www.stemcellresearch.org

ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS MADRE ADULTAS

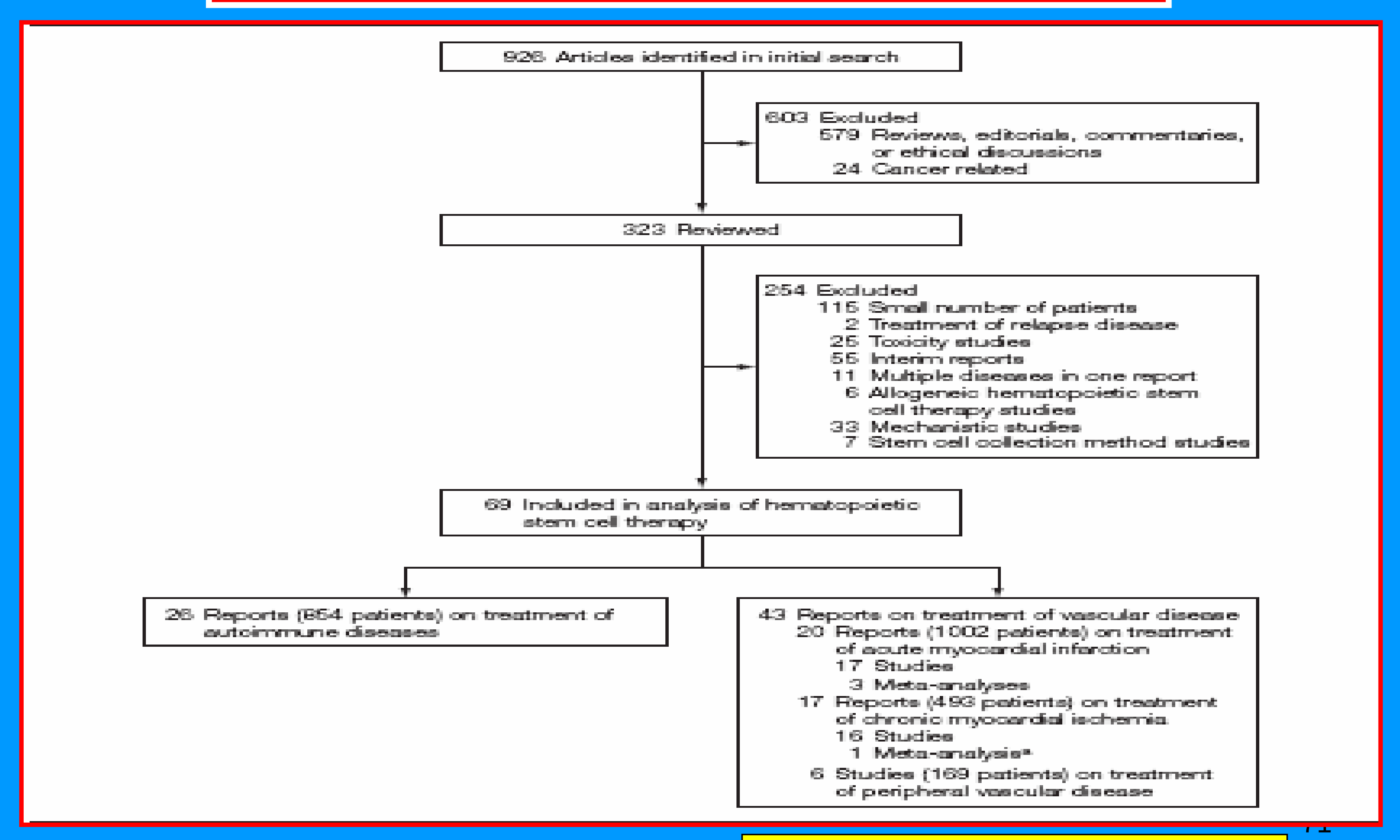
APLICACIONES CLÍNICAS DE LAS CÉLULAS MADRE ADULTAS

En un interesante artículo de febrero de 2008 se revisan los estudios realizados entre enero de 1997 y diciembre de 2007 sobre la utilización de las células madre de tejidos adultos con fines terapéuticos

FUENTES: MEDLINE, EMBASE, Science Citatim Index, pagmes web FDA y de INS de Estados Unidos

R.K. Burt y col. JAMA 299; 925-936, 2008

ENSAYOS CLÍNICOS CON CÉLULAS MADRE ADULTAS



Burt, R. K. et al. JAMA;299,925-936,2008

Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction With >=30 Patients

Table 3. Clinical Trials of Stem Cell Therapy for Acute Myocardial Infarction With ≥30 Patients

Source	Trial	No. of Patients	Days After Acute MI	Follow-up, mo	Control Infusion	Stem Cell Source	LVEF Outcome, Treatment/Control; Comment
Choi et al,[73] 2007	Unblinded	73	5-19	24	None	Peripheral blood	NS
Kang et al,[64] 2007	MAGIC Cell 1	30	NA[a]	24	G-CSF	Peripheral blood	Improved in infusion group compared to G-CSF
Li et al,[70] 2007	Unblinded	70	6	6	Untreated	Peripheral blood	Improved 7.1%/1.6%
Tatsumi et al,[72] 2007	Unblinded	54	<5	6	None	Peripheral blood	Improved 13.4%/7.4%
Janssens et al,[67] 2006	Randomized	67	1-2	4	Placebo	Bone marrow	3.3%/2.2% reduced infarct size (NS)
Kang et al,[65] 2006	MAGIC Cell-3-DES	82	NA	6	Acute MI/old MI/untreated	Peripheral blood	Improved 5.1%/−0.2%
Lunde et al[63] 2006	ASTAMI	100	4-8	6	None	Bone marrow	Improved 3.1%/2.1% (NS)
Meyer et al,[61] 2006	BOOST	60	4.8[b]	18	None	Bone marrow	Improved 5.9%/3.1% (NS)
Mansour et al,[69] 2006	Nonrandomized	38	NA	4-8	None	CD133	LVEF not examined; increased infarct-related artery restenosis
Meluzin et al,[71] 2006	Randomized[c]	66	5-9	3	None	Bone marrow	Improved 5%/2% in high dose
Schächinger et al,[58] 2006	REPAIR-AMI	204	3-7	4	Placebo	Bone marrow	Improved 5.5%/3.0%
Schächinger et al,[59] 2006	REPAIR-AMI	204	3-7	12	Placebo	Bone marrow	Improved outcome of death, reinfarction, revascularization
Schaefer et al,[62] 2006	BOOST	59	4.5[b]	18	None	Bone marrow	Improved diastolic function (NS)
Bartunek et al,[68] 2005	Unblinded	35	11.6[c]	4	None	CD133	Improved/increased infarct-related artery restenosis
Chen et al,[66] 2004	Randomized	69	>18	6	Placebo	Mesenchymal	Improved 18%/6%
Schächinger et al,[57] 2004	TOPCARE-AMI	54	3-7	12	None	Bone marrow or CPCs	Improved 8% for both bone marrow and CPCs at 4 mo
Wollert et al,[60] 2004	BOOST	60	4.8[b]	6	None	Bone marrow	Improved 6.7%/0.7%

Abbreviations: ASTAMI, Autologous Stem Cell Transplantation in Acute Myocardial Infarction; BOOST, Bone Marrow Transfer to Enhance ST Elevation Infarct Regeneration Trial; CPC, circulating progenitor cell; G-CSF, granulocyte colony–stimulating factor; LVEF, left ventricular ejection fraction; MAGIC, Myocardial Regeneration and Angiogenesis in Myocardial Infarction With G-CSF and Intracoronary Stem Cell Infusion; MAGIC Cell-3-DES, MAGIC-3-Drug Eluting Stents; MI, myocardial infarction; NA, not available; NS, not significant; REPAIR-AMI, Reinfusion of Enriched Progenitor Cells and Infarct Remodeling in Acute Myocardial Infarction; TOPCARE-AMI, Transplantation of Progenitor Cells and Regeneration Enhancement in Acute Myocardial Infarction.

[a] Study assessed both acute and old MI.

[b] Mean value.

[c] Randomized to high-dose, low-dose, or no cells.

Burt, R. K. et al. JAMA;299,925-936,2008

ENSAYOS CLÍNICOS EN INFARTO DE MIOCARDIO AGUDO

VALORACIÓN GLOBAL

Se observa un modesto beneficio de la fracción de eyección ventrícular izquierda

En los interensayos es de 8’6 % y en los intraensayos del 2’4 %

No se producen efectos secundarios negativos

Burt, R. K. et al. JAMA;299,925-936,2008

ENSAYOS CLÍNICOS EN ENFERMEDAD ISQUÉMICA CORONARIA CRÓNICA

VALORACIÓN GLOBAL

Aumento de la perfusión regional

Mejora de la contractibilidad cardiaca

Modesto aumento de la fracción de eyección ventricular izquierda

Reducción del dolor anginoso

Burt, R. K. et al. JAMA;299,925-936,2008

UTILIZACIÓN CLÍNICA DE CÉLULAS MADRE DE MUSCULO ESQUELÉTICO

INFARTO DE MIOCARDIO

Entre los ensayos clínicos en marcha está el Marvel, ensayo de fase II/III, ramdomizado, doble ciego y placebo controlado, cuyos resultados se esperan tener a mediados de 2010

Journal of Clinical Investigation 120; 11-19, 2010

ACCIONES FUTURAS EN RELACIÓN CON EL INFARTO DE MIOCARDIO

En la mayoría de los estudios el número de miocardiocitos que se generan y que se integran en el miocardio lesionado es demasiado pequeño para justificar la mejora de la función cardiaca observada

Esta mejora podría deberse a un efecto paracrino, por lo que la identificación de los factores que condicionan esta acción celular puede ser importante

Utilizar las células adecuadas en el lugar adecuado y desarrollar métodos más eficientes para generar el tipo celular deseado

Conocer mejor los mecanismos que regulan el metabolismo de los miocardiocitos

Conocer mejor los mecanismos del "homing"

Definir los factores presentes en el entorno celular lesionado que limitan la supervivencia y la integración funcional de las células transplantadas

Supresión del rechazo inmunológico para mejorar el efecto terapéutico

VFM Segers y RT Lee Nature 451; 937-942, 2008
H.E. Fleming. Cell 132; 505-509, 2008

UTILIZACIÓN CLÍNICA DE CÉLULAS MADRE DE MUSCULO ESQUELÉTICO

DISTROFIA MUSCULAR

En el momento actual existen 11 ensayos en pacientes con distrofia muscular de Duchenne

No se han producido efectos adversos y se ha demostrado producción de distrofina en algunos pero no en todos

Se detectó mejora funcional muscular en el 15% de los pacientes

Journal of Clinical Investigation 120; 11-19, 2010

UTILIZACIÓN CLÍNICA DE CÉLULAS MADRE DE MUSCULO ESQUELÉTICO

DISTROFIA MUSCULAR

Problemas técnicos

Las células madre no se distribuyen uniformemente por todos los músculos afectados

Se han descrito reacciones inmunológicas adversas

Se ha constatado la muerte rápida de las células inyectadas

Journal of Clinical Investigation 120; 11-19, 2010

UTILIZACIÓN CLÍNICA DE CÉLULAS MADRE DE MUSCULO ESQUELÉTICO

INCONTINENCIA URINARIA

Aunque los estudios hasta ahora realizados en la incontinencia urinaria no han sido randomizados, si que han demostrado una marcada mejoría clínica en la mayoría de los pacientes

World Urol 25; 385-392, 2007
Int Urogynecol J Pelvic Floor Dysfunct 19; 881-883, 2008

USO DE CÉLULAS MADRE ADULTAS EN EL ÁREA NEUROLÓGICA

Se han realizado numerosos ensayos clínicos para el tratamiento de la enfermedad de Parkinson, esclerosis lateral amniotrófica, Alzheimer y otras enfermedades neurodegenerativas, aunque "no se han conseguido verdaderos beneficios para estos pacientes"
También en casos de stroke existe abundante experiencia preclínica, así como en lesiones de médula espinal

The Journal of Clinical Investigation 2010; 120: 29-40

USO DE CÉLULAS MADRE ADULTAS EN EL ÁREA NEUROLÓGICA

En cuanto a las perspectivas futuras parece que los estudios orientados a la remielinización de la médula espinal lesionada empezarán pronto y que células productoras de dopamina se podrían utilizar en potentes en Parkinson en cinco años. Sin embargo, el tratamiento de pacientes con esclerosis lateral amniotrófica parecen más distantes, y aun más para pacientes de Alzaheimer que aun están más lejanos

The Journal of Clinical Investigation 2010; 120: 29-40

USO DE CÉLULAS MADRE ADULTAS EN EL ÁREA NEUROLÓGICA

En general parece que hay un amplio consenso que para aplicar las células madre adultas para el tratamiento de enfermedades neurológicas degenerativas y traumáticas se requiere mucho más investigación básica para conocer los mecanismos biológicos que regulan la proliferación, migración, diferenciación, supervivencia y función de las células madre y de sus derivados, para que siendo bien conocidos puedan ser bien controlados

The Journal of Clinical Investigation 2010; 120: 29-40

TERAPIA CELULAR

OPCIONES FUTURAS

Terapia celular preparada de forma individual para cada paciente

Bancos universales de células madre

Utilización de fármacos que estimulen el aumento endógeno de células madre

G.Q. Daley y D.T. Scadden
Cell 132; 544-548, 2008

POSIBLE ALTERNATIVA AL TRANSPLANTE DE ÓRGANOS

PRODUCCIÓN DE UN CORAZÓN BIOARTIFICIAL

El equipo de Doris A Taylor, de la Universidad de Minessota, ha conseguido por primera vez crear un corazón bioartificial

HC Ott. Nature Medicine 14; 213-221, 2008

PRODUCCIÓN DE UN CORAZÓN BIOARTIFICIAL

METÓDICA PARA OBTENERLO

Descelularización de corazones de cadáver de rata por perfusión con detergentes

Mantenimiento de la matriz extracelular, con conservación de una estructura espacial cardiaca acelular

Reperfusión con células cardiacas neonatales o células endoteliales aórticas de rata

Cultivo de estas estructuras recelularizadas en un medio similar al que se utiliza para el mantenimiento de órganos

Mantenimiento de la perfusión durante 28 días

HC Ott. Nature Medicine 14; 213-221, 2008

PRODUCCIÓN DE UN CORAZÓN BIOARTIFICIAL

RESULTADOS

A los 4 días de finalizar la reperfusión celular la estructura cardiaca generada empezó a contraerse

A los 8 días adquirió la función de bomba cardiaca

HC Ott. Nature Medicine 14; 213-221, 2008

ALTERNATIVAS PARA LA OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE DE TIPO EMBRIONARIO

CONSIDERACIONES BIOLÓGICAS Y ÉTICAS

ALTERNATIVAS AL USO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Para obtener células madre embrionarias hay que destruir al embrión del cual se obtienen, lo que indudablemente supone un importante problema ético

Por ello, hace unos años se planteó el reto de obtener células madre similares a las embrionarias humanas por procedimientos que no requirieran la destrucción de embriones

Best Practical Research Clinical Obstetrics and Gynecology 18; 929-940, 2004

ALTERNATIVAS AL USO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Esta inquietud fue recogida por el Consejo Asesor de Bioética del presidente de Estados Unidos, que en 2005 propuso cuatro posibles alternativas

White Paper Alternate Sources of Human Pluripotent Stem Cells. Washington DC. President's Councel on Bioethics. 2005

ALTERNATIVAS AL USO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

Posteriormente estas cuatro propuestas se ampliaron a ocho:

1. Embriones en fase de utilización muy temprana de desarrollo
2. Estructuras biológicas no embrionarias generadas por transferencia nuclear somática alterada (ATN)
3. Estructuras biológicas obtenidas por transferencia nuclear somática alterada (ATN) con reprogramación asistida del ovocito (OAR)

ALTERNATIVAS AL USO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS

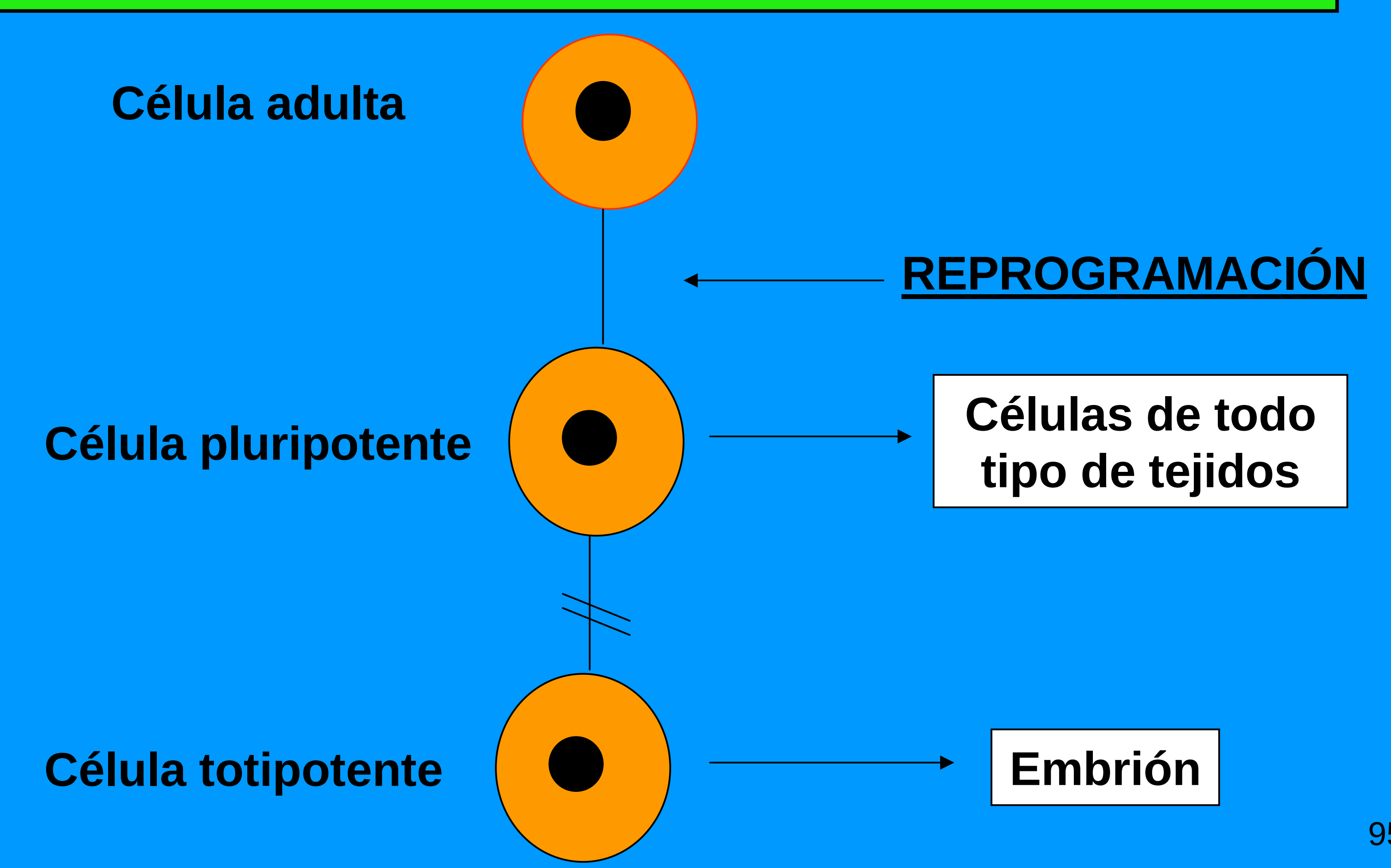
4. **De pseudoembriones**
5. **De células madre germinales**
6. **De ovocitos activados por partenogénesis**
7. **Por fusión de núcleos de células somáticas adultas con células madre embrionarias**
8. **Por reprogramación de células somáticas adultas**

DE ESTAS POSIBILIDADES LA MÁS VENTAJOSA, TANTO DESDE UN PUNTO DE VISTA TÉCNICO COMO ÉTICO, ES LA REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS ADULTAS

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE SIMILARES A LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS POR REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE CÉLULAS ADULTAS

OBTENCIÓN DE CÉLULAS MADRE SIMILARESA LAS CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS POR REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE CÉLULAS ADULTAS

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS



CÉLULAS MADRE. PASADO Y FUTURO

PASADO

FUTURO









James Thomson
1998

Shinya Yamanaka
2006

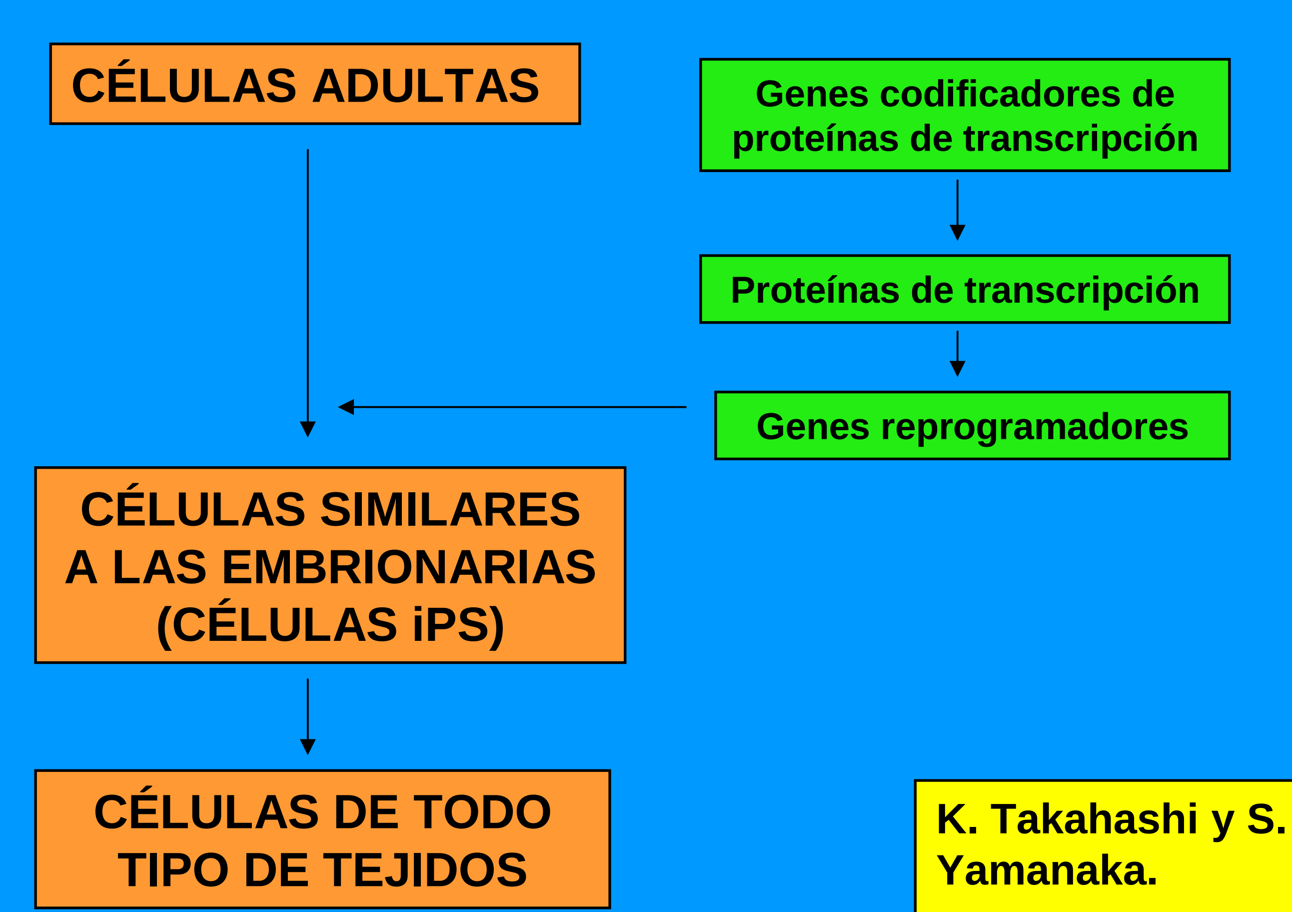
2007

Cultivan por primera vez células madre embrionarias humanas

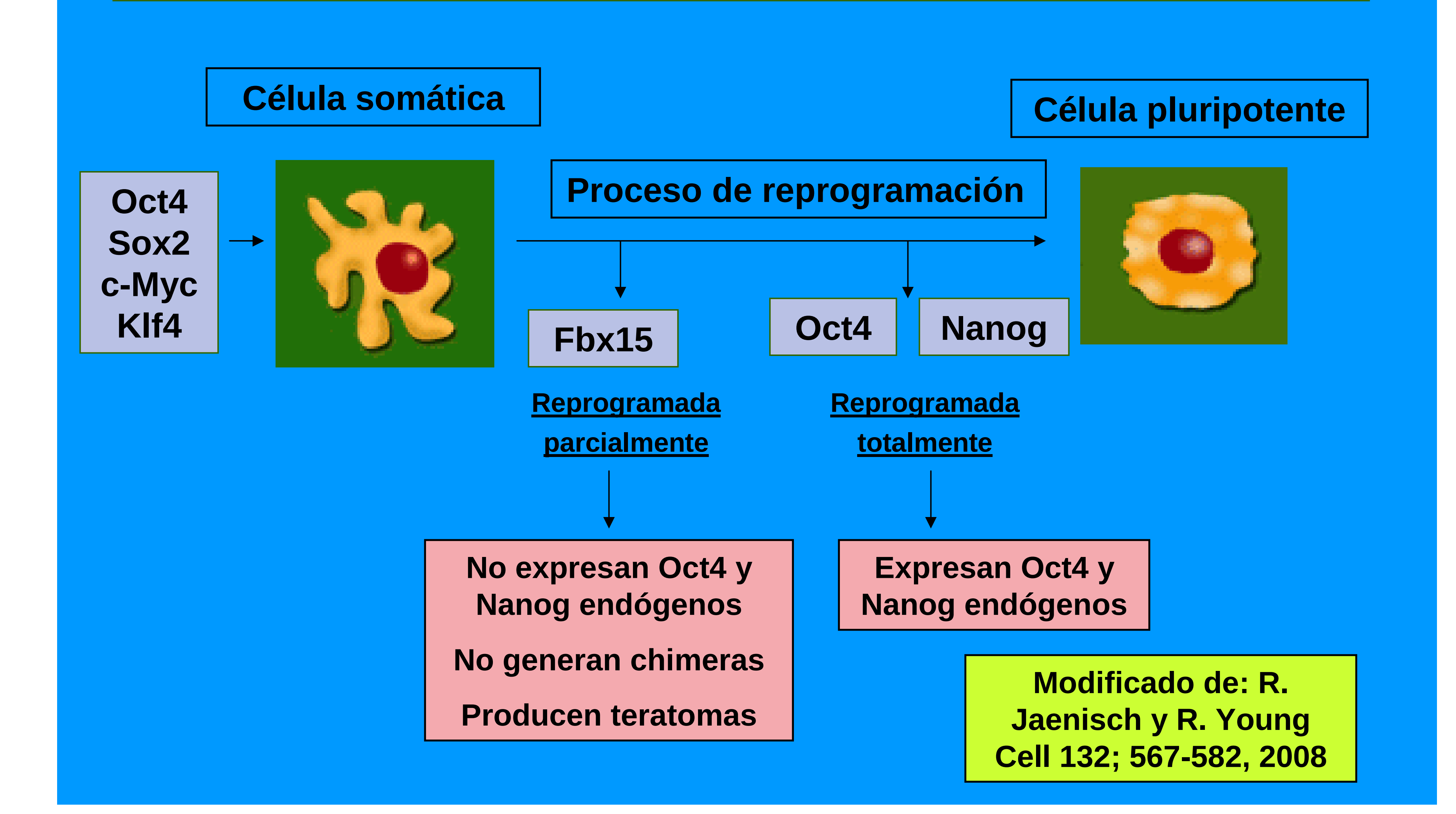
Obtienen células similares a las embrionarias por reprogramación de células adultas. Nacen las células iPS

Obtienen células iPS humanas

REPRODUCCIÓN DE CÉLULAS ADULTAS ANIMALES



REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS SOMÁTICAS A UN ESTADO PLURIPOTENTE



REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS ANIMALES

Estos resultados fueron ampliados y confirmados en un trabajo posterior del grupo de Yamanaka

Además, si las células iPS se inyectaban en blastocistos murinos se conseguían quimeras adultas de ratones que eran capaces de transmitir sus características genéticas a la siguiente generación

K. Okita y col. Nature 448; 313-317, 2007

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS ANIMALES

Confirman las experiencias realizadas en animales por Takahashi y Yamanaka

M. Wernig y col. Nature; 318-324, 2007

Confirman las anteriores experiencias y además consiguen producir quimeras que si son inyectadas en blastocistos murinos pueden generar embriones vivos

N. Maherali y col. Cell Stem Cell 1; 55-70, 2007

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

Pero el paso de las experiencias animales a humanos no parecía fácil

Así, Janet Rossant se preguntaba:

"¿Serán eficientes los mismos mágicos factores moleculares para generar células iPS humanas?

Diversos grupos están intentándolo, pero trasladar estas pruebas a humanos tiene muchas dificultades"

J. Rossant. Nature 448; 260-262, 2007

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

EXPERIENCIAS DE LOS GRUPOS DE SHINYA YAMANAKA Y JAMES THOMSON

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

Thomson pensaba que la posibilidad de reprogramar células adultas humanas tardaría al menos 20 años

Citado por:
B Goldman
Nature Reports Stem Cells
DOI: 10.1038/stemcells.2008.67

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

Por ello, cuando se logró la reprogramación de células adultas humanas:

"Nosotros no podíamos creer que la reprogramación fuera tan fácil"

Citado por:
B Goldman
Nature Reports Stem Cells
DOI: 10.1038/stemcells.2008.67

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

En efecto en noviembre de 2007, 16 meses después de la publicación de las experiencias de reprogramación celular en animales llevadas a cabo por Takahasi y Yamanaka, se consigue, por el propio grupo de Yamanaka y también el de Thomson, la reprogramación de células adultas humanas.

Contrasta esta rapidez con los 17 años que transcurrieron desde que se obtuvieron células madre embrionarias de ratones[1] hasta que se consiguió lo mismo en humanos [2]

1. M Evans y col
Nature 292; 154-156, 1981
2. JR Martin
PNAS 78; 763-7638, 1981
3. JA Thomson y col
Science 282; 1145-1147, 1998

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

CÉLULAS DE PIEL HUMANA

GENES REPROGRAMADORES

CÉLULAS iPS

CÉLULAS DE TODO TIPO DE TEJIDOS

J. Yu y col. (grupo Thomson).
Science 318; 1917-1920, 2007

K. Takahashi y col. (grupo Yamanaka).
Cell 131; 861-872, 2007

GENES REPROGRAMADORES

¿Cuántos genes se requieren para obtener las células iPS?

GENES REPROGRAMADORES

Takahasi y Yamanaka

partieron de 24 genes reprogramadores

Cell 126; 663-676, 2006

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

Takahashi y col. (grupo Yamanaka):

Genes reprogramados: *Oct ¾, Sox2, c-Myc y Klf4*

Medio para transferirlos: retrovirus

Fuente de células adultas: prepucio de recién nacido

Yu y col. (grupo Thomson):

Genes reprogramados: *Oct ¾, Sox2, Lin 28 y Nanong*

Medio para transferirlos: lentivirus

Fuente de células adultas: fibroblastos fetales y neonatales

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

Las células iPS generadas muestran expresión génica y modelos de metilación muy parecidos a los de las células madre embrionarias, crecen internamente mientras expresan telomerasa, tienen un cariotipo normal y forman teratomas si se trasplantan a ratones inmunosuprimidos

Ch.E. Murry y G. Keller. Cell 132; 661-680, 2008

SIMILITUD ENTRE LAS CÉLULAS iPS Y LAS EMBRIONARIAS HUMANAS

Biológicamente no hay diferencias entre las células iPS y las embrionarias humanas, aunque para confirmarlo totalmente habría que producir embriones humanos por clonación a partir de las células iPS y comprobar la similitud biológica de sus células embrionarias con las de embriones obtenidos por fecundación in vitro o transferencia nuclear somática, lo cual éticamente no es posible llevar a cabo

GENES REPROGRAMADORES

El Oct4 es altamente específico para las células pluripotentes

Los otros tres factores se expresan en otras células:

Sox2 en células madre neurales y células progenitoras

Klf4 en células de piel, estómago, intestino y músculo esquelético

c-Myc se expresa aleatoriamente

El único gen que parece no puede ser reemplazado para la reprogramación es el Oct4

Nakagawa et al (Yamanaka)
Nature Biotechnology 26; 101-106, 2008

GENES REPROGRAMADORES

En efecto, Kim et al han demostrado que se pueden conseguir células iPS reprogramando células madre neurales utilizando como factor de trascripción únicamente el Oct4

Kim et al
Cell 136; 411-419, 2009

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

CONFIRMACIÓN DE LAS EXPERIENCIAS DE YAMANAKA Y THOMSON

IH Park y col. (grupo de G.Q. Daley) derivan células iPS de células adultas, especialmente de fibroblastos de fetos neonatos y sujetos adultos, utilizando los cuatro mismo genes reprogramadores

Comprueban que los factores de reprogramación fundamentales son el Oct-4 y el Sox2

Las células iPS se asemejan a las embrionarias humanas en morfología y expresión génica y tienen la capacidad de producir teratomas en ratones inmunodeficientes

I-H. Park. Nature 451; 141-146, 2008

REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS HUMANAS

Consiguen generar células iPS a partir de fibroblastos de piel humana que pueden diferenciarse a todo tipo de tejidos, lo que avala su pluripotencialidad

WE Lowry y col. PNAS 105; 2883-2888, 2008

INTERÉS POR LA REPROGRAMACIÓN CELULAR

Como consecuencia del interés clínico y experimental que tienen las células iPS, numerosos laboratorios han iniciado trabajos destinados a obtenerla.

En efecto, según comenta Melina Fan, directora ejecutiva de Addgene, de Cambridge (Massachusetts), que distribuye los vectores virales utilizados por Yamanaka y Thomson, con fecha 17 de abril de 2008, habían recibido 704 peticiones, de 178 laboratorios pertenecientes a 142 instituciones el vector viral utilizado por Thomson y 514 de 131 laboratorios pertenecientes a 113 instituciones del vector utilizado por Yamanaka para la transferencia de los factores de trascripción a células humanas, así como más de 1500 peticiones procedentes de 232 laboratorios pertenecientes a 215 instituciones del vector utilizado para la transferencia a células murinas

Nature Reports Stem Cells
DOI: 10.1038/stemcells.2008.67

IMPORTANCIA DE LA REPROGRAMACIÓN CELULAR

La revista Science ha calificado la reprogramación celular como el descubrimiento científico del año 2008 por la utilidad que puede tener en la investigación de graves enfermedades y por su probable utilización dentro del campo de la medicina regenerativa y reparadora

Science 322; 1767-1773, 2008

INCONVENIENTES TÉCNICOS

Posibilidad de transmisión de enfermedades virales

Posibilidad, aunque menor, de producir tumores

Posibles problemas génicos debido a la introducción del ADN de los genes reprogramadores en las células receptoras

Lo que puede facilitar una integración genómica aleatoria y riesgo de ocasionar mutagénesis

MF Pera y K Hasegawa Nature Biotechnology 26; 59-60, 2008

INCONVENIENTES TÉCNICOS

Además, aunque los genes reprogramadores son generalmente silenciados después de la reprogramación, la activación epigenética del Oct-4 y Sox2 podría inducir efectos no deseados en las células iPS transferidas

MF Pera y K Hasegawa Nature Biotechnology 26; 59-60, 2008

PROBLEMAS A RESOLVER

Técnicos:

Sustituir los vectores virales

Sustituir el oncogén c-Myc

Biológicos:

Conocer mejor los mecanismos de la reprogramación celular, especialmente si es debida a modificaciones epigenéticas o a modificaciones genéticas todavía no identificadas

J. Cibelli. Science 318; 1879, 2007

PROBLEMAS RESUELTOS

El mismo grupo de Yamanaka, en el reducido tiempo de tres meses, consigue reprogramar hepatocitos y células de epitelio de mucosa gástrica sin utilizar el c-Myc, tanto en humanos como en ratones, sin que se generaran tumores

N. Nakagama y col. Nature Biothecnology 26; 101-106, 2008

PROBLEMAS RESUELTOS

Otros autores también consiguen generar células sin utilizar el c-Myc

Wernig M y col

Cell Stem Cell 2; 10-12, 2008

T Brambrink y col

Cell Stem Cell 2; 151-159, 2008

PROBLEMAS RESUELTOS

Con relación a la utilización de vectores virales Aoki y colaboradores comprueban que al reprogramar células de estómago e hígado murinas, utilizando retrovirus estos no penetran en la célula adulta a reprogramar y por tanto no alteran su genoma

T. Aoki y col. Science: DOI 10.1126 / science 1154884 (14 – 2 – 2008)

PROBLEMAS RESUELTOS

Consiguen introducir los factores de trascripción utilizando vectores virales que no llegan a integrarse en el genoma de las células receptoras

Con este sistema evitar la formación de tumores y las alteraciones génicas del genoma de las células receptoras

De las células iPS consiguen derivar células de músculo, sistema nervioso, corazón y pulmón

Esta técnica permite pensar en utilizar las células iPS en ensayos clínicos con humanos

M Stadtfeld y col. Science: DOI 10.1126 / science 1162494

OBTENCIÓN DE CÉLULAS iPS SIN INTEGRACIÓN DEL GENOMA VIRAL

Generan células iPS a partir de:

- **Hepatocitos de ratón utilizando adenovirus para transferir factores reprogramadores**

Stadtfeld et al
Science 322; 945-949, 2008

- **Fibroblastos de embriones de ratón utilizando plásmidos**

Okita et al (Yamanaka)
Science 322; 949-953, 2008
Kaji et al
Nature DOI: 10.1038/nature 07864, 2009

GENERACIÓN DE CÉLULAS iPS UTILIZANDO COMPUESTOS QUÍMICOS

Utilizan productos químicos que pueden reemplazar uno o dos genes reprogramados

Huangfu et al

Nature Biotechnology 26; 1269-1275, 2008

Shi et al

Cell Stem Cell 2; 525-528, 2008

GENERACIÓN DE CÉLULAS iPS UTILIZANDO PEQUEÑAS MOLÉCULAS

Pequeñas moléculas que inhiben el ácido valpróico inducen reprogramación utilizando solo Oct4 y Sox2

Otra molécula, el kenpaullné, puede sustituir el Klf4

PNAS 106; 8912-8917, 2009

FACTORES DE REPROGRAMACIÓN

Producción de células iPS utilizando:

Vectores episomales que no se integran en el genoma de la célula generada. Los restos genómicos episomales que queden se eliminan y así la célula iPS generada queda libre se secuencias transgénicas extrañas

Yu et al (Thomson)

Science 324; 797-801, 2009

Utilizan doxyciclina para potenciar la acción de los vectores víricos (lentivirus) y posteriormente la recombinasa Cr/LoxP para eliminar los restos trangénicos que se hayan podido insertar

Soldner et al

Cell 136; 964-977, 2009

Utilizan plásmidos del tipo piggy Bac

Woltjen et al
Nature DOI: 10.1038/nature 07863.2009

OBTENCIÓN DE CÉLULAS iPS SIN INTEGRACIÓN DEL GENOMA VIRAL

Posibilidad de crear células iPS utilizando un único vector policistrónico no vírico obtenido a partir de un plasmido que favorece la expresión de Oct4, Sox2, Klf4 y c-Myc, que evita la inserción del genoma vírico en las células generadas

Gonzalez et al

PNAS 106; 8918-8922, 2009

ALTERNATIVA A LA UTILIZACIÓN DE VECTORES VIRALES

Prime Gen, una empresa californiana de biotecnología, conjuntamente con Unidyn, fabricante de nanotubos (cilindros de moléculas de carbono de pocos nanometros de diámetro) ha anunciado que se pueden sustituir los vectores virales necesarios para la reprogramación celular, por nanotubos de carbono, tras demostrar que con ellos se pueden introducir proteínas complejas (hasta una docena) en células testiculares y de retina

D Cyranoski y M Baker Nature 452;132-136, 2008

ALTERNATIVA A LA UTILIZACIÓN DE VECTORES VIRALES

Sin embargo, existen justificados reticencias entre los expertos, sobre la bondad de estas experiencias pues las mismas aun no han sido publicadas en una revista científica de garantía

Además algunos autores indican que su introducción en las células puede tener efectos tóxicos para ellas, incluso puede ocasionar su muerte

Por ello, los propios fabricantes admiten la existencia de algunos problemas que hay que resolver antes de pasar a su utilización clínica

D Cyranoski y M Baker

Nature 452;132-136, 2008

ALTERNATIVAS A LA UTILIZACIÓN DE VECTORES VIRALES

Otra posibilidad es reemplazar los vectores virales introduciendo directamente los factores reprogramadores con ciertos aminoácidos unidos a ellos, lo que les permite penetrar las membranas celulares

También utilizando pequeñas moléculas no protéicas que remeden la actividad de los factores de trascripción y que puedan penetrar las membranas celulares

B Goldman

Nature Reports Stem Cells DOI: 101038/stemcells.2008.67

1st May 2008

MEJORAS DE LA TÉCNICA DE OBTENCIÓN DE CÉLULAS iPS

También el equipo de R Jaenisch del Instituto Tecnológico de Massachusetts utiliza la doxicilina para mejorar la técnica de reprogramación de células adultas y conseguir células iPS de segunda generación

Las células obtenidas tienen una gran homogeneidad genética lo que favorece su posible uso clínico

Cell Stem Cell 3; 346-353, 2008

VENTAJAS E INCONVENIENTES DEL USO DE LAS CÉLULAS iPS

VENTAJAS TÉCNICAS

No inducen rechazo inmunológico

Lo que abre la posibilidad de crear fármacos específicos para un paciente determinado

No requiere la utilización de ovocitos humanos

Facilidad técnica

Coste reducido

POSIBLES UTILIZACIONES DE LAS CÉLULAS iPS

POSIBLE UTILIDAD DE LAS CÉLULAS iPS

Podrían tener tres posibles aplicaciones

Para estudios experimentales sobre la diferenciación celular y para valorar posibles diferencias entre células normales y patológicas

Para estudios farmacológicos, que ahora solo es posible realizar en animales

Para su uso en la medicina regenerativa

UTILIDAD EXPERIMENTAL DE LAS CÉLULAS iPS

Las células iPS podrían suplir mucha de la información que ahora proporcionan las células madre embrionarias en investigación y en medicina

MF Pera Nature 451; 135-136, 2008

OTRAS APLICACIONES DE LAS CÉLULAS iPS

Las células iPS pueden ser el más práctico y eficiente camino para producir grandes bancos de células humanas pluripotentes de los haplotipos deseados

Esto evitaría el uso y destrucción de miles de embriones

MF Pera y K Hasegawa Nature Biotechnology 26; 59-60, 2008

NUEVAS POSIBILIDADES DE REPROGRAMACIÓN DE CÉLULAS ADULTAS

REPROGRAMACIÓN DIRECTA DE CÉLULAS ADULTAS

En el Instituto Médico Horward Hughes en colaboración con el Instituto de Células Madre de la Universidad de Harvard, el equipo dirigido por D Melton ha conseguido reprogramar células adultas de ratón (células exocrinas del páncreas) en células beta productoras de insulina

Con esta técnica se evita el paso intermedio de convertir la célula adulta en una célula pluripotencial

Los factores de trascripción que utilizan son el Ngn3, Pdx1 y Mafa

Nature DOI: 10.1038/nature 07314

¿PUEDEN LAS CÉLULAS iPS HACER INNECESARIO EL USO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS?

Sería un importante error llegar a la conclusión de que la obtención de las células iPS evita la necesidad de usar células madre embrionarias

I Hyun y col. Cell Stem Cell 1; 367-368, 2007

D Melton: Es prematuro afirmar esto

GQ Daley: En el momento actual no estamos seguros de que las células iPS sean absolutamente equivalentes a las células madre embrionarias

K Egan: Para estar seguro de la utilidad de las células iPS se necesita hacer un gran número de experiencias con células iPS de diferentes individuos y compararlos con células madre embrionarias

C Holden y G Vogel Science319; 560-563, 2008

¿PUEDEN LAS CÉLULAS iPS HACER INNECESARIO EL USO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS?

La investigación con células iPS debería continuar junto con la investigación con células madre embrionarias

I-Hyun Park. Hastings Center Report 38; 20-22, 2008

BM Kuehn JAMA 299; 26, 2008

¿PUEDEN LAS CÉLULAS iPS HACER INNECESARIO EL USO DE CÉLULAS MADRE EMBRIONARIAS?

Sin embargo, la gran mayoría de investigadores que trabajan en este campo creen que las células iPS sustituirán con ventaja a las células madre embrionarias, tanto con fines experimentales como terapéuticos

CONSECUENCIAS DEL DESCUBRIMIENTO DE LAS CÉLULAS iPS

Por ello, Ian Wilmut el creador de la oveja Dolly, manifiestaba recientemente que iba a abandonar la clonación para utilizar las células iPS

R Highfield Daily Telegraph (http://www.telegraph.co.uk) 16-XI-2007

Y el propio James Thomson comentaba (Gina Kolata. The New York Times, 22/11/2007) que probablemente "dentro de una década la guerra de las células madre embrionarias será solo una nota al pie de una página curiosa de la historia de la ciencia"

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS

EXPERIENCIAS PRE CLÍNICAS

La posibilidad de generar células iPS de pacientes concretos ha abierto la puerta a la medicina personalizada regenerativa por un camino éticamente correcto

Kiskinis E and Eggan K. J Clin Invest 2010; 120: 51-59

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS EN RATONES CON ANEMIA FALCIFORME

Se obtienen células somáticas de ratones con anemia falciforme y tras ser corregida la anomalía genética por terapia génica molecular se generan células iPS

A partir de ellas se generan células madre hematopoyéticas normales que se pueden reinyectar en ratones con anemia falciforme, consiguiendo mejorar sensiblemente su cuadro clínico

Hanna J et al

Science 318; 1920-1923, 2007

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS EN RATONES CON PARKINSON

Demuestran que células iPS se pueden diferenciar en células madre precursoras neurales que en cultivo puede generar células neurales o de glia

Si las células generadas se transfieren al cerebro de fetos de ratones, migran a distintas regiones y se diferencian en glia y neuronas

También las células iPS se diferencian a neuronas dopaminérgicas

Cuando las neuronas dopaminérgicas se transplantan a cerebro de ratas con Parkinson se consigue mejorar sus síntomas clínicos

Estos resultados demuestran el potencial terapéutico de células iPS procedentes de fibroblastos para el reemplazo de células neuronales patológicas en un modelo animal

M Wernig y col PNAS 105; 5856-5861, 2008

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS EN RATONES CON HEMOFILIA A

Se producen células iPS a partir de fibroblastos de la cola de ratones que posteriormente se diferencian a células endoteliales y células progenitoras endoteliales.

Se comprueba que estas células producen factor VIII

Las células endoteliales o sus progenitoras producidas se inyectan a ratones con hemofilia A

Se comprueba que el factor VIII se incrementa hasta un nivel de 8% a 12%

Comprobándose además que los ratones transplantados sobreviven mucho mas tiempo que los a ratones del grupo control

Xu D, et al. PNAS 2008; 105:5856-5861

EXPERIENCIAS PRECLÍNICAS EN RATONES CON INFARTO DE MIOCARDIO

A partir de fibroblastos humanos se producen células iPS

Estas se insertan en mórulas de ratones

De las quimeras producidas, se produce parenquima cardiaco normal, que se puede transferir a corazones de ratones enfermos, consiguiendo la mejora funcional de los mismos

Esto demuestra que las células iPS pueden ser útiles en el tratamiento de la enfermedad cardiaca

Nelson et al

Circulation 120; 408-416, 2009

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

La posibilidad de generar células iPS a partir de células somáticas, generalmente fibroblastos, ha abierto un nuevo y útil camino para estudiar la patogenia de graves enfermedades, así como para ensayar nuevas posibilidades terapéuticas para ellas

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

Las primeras experiencias en este sentido lograron derivar, de fibroblastos de una mujer de 82 años que padecía una esclerosis lateral amiotrófica, células iPS y posteriormente diferenciarlas a neuronas motoras, similares a las destruidas en la paciente

Dimos J, et al. Science 2008; 321: 1218-1221.

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

También se han podido derivar células iPS en pacientes con síndrome Shwahman-Bodian-Diamond, enfermedad de Gaucher de tipo 3, distrofia muscular de Duchenne, enfermedad de Parkinson, enfermedad de Huntington, diabetes mellitus tipo 1, síndrome de Down y síndrome de Lesch-Nyhan

Park I H, et al. Cell 2008; 134: 877-886

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

Igualmente a partir de fibroblastos de piel de un niño con atrofia muscular espinal se han podido derivar células iPS que mantenían el genotipo de esta enfermedad de las que se pudieron derivar neuronas motoras con el trastorno genético de estos pacientes

Ebert A, et al. Nature 2009; 457: 277-280

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

En marzo de 2009 a partir de fibroblastos de 5 pacientes con enfermedad de Parkinson se pudieron producir neuronas dopaminérgicas

Soldner F, et al. Cell 2009; 136: 964-977

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

En julio de 2009 se logró también obtener células iPS de pacientes con anemia de Fanconi con la particularidad de que las células somáticas fueron previamente tratadas con terapia génica para corregir su defecto genético, por lo que las células iPS producidas eran normales siendo posiblemente útiles para ser transplantadas a pacientes con anemia de Fanconi

Raya A, et al. Nature 2009; 460: 53-59

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

También a partir de células $CD34^+$ obtenidas de sangre de dos pacientes con trastornos mieloproliferativos se han obtenido células iPS que podrían servir para profundizar en el estudio de la patogenia de estas enfermedades

Ye Z, et al. Blood 2009; 114: 5473 – 5480

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

Igualmente de pacientes con disautomanía, una neuropatía causada por una mutación genética puntual, se han podido desarrollar células iPS sobre las cuales se han experimentado nuevos fármacos para tratar esta enfermedad

Lee G, et al. Nature 2009; 461: 402-406

LÍNEAS CELULARES OBTENIDAS DE CELULAS IPS DERIVADAS DE PACIENTES CON DISTINTAS PATOLOGÍAS

Finalmente también se han podido derivar células iPS de pacientes con diabetes mellitus de tipo 1. Estas células denominadas por los autores células DiPS se han podido diferenciar a células productoras de insulina, por lo que podrían ser útiles tanto para estudiar la patogenia de la enfermedad como para abrir una nueva expectativa terapéutica para estos pacientes

Maehr R, et al. PNAS 2009; 106: 15768-15773

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

A partir de células iPS, además de poder obtenerse líneas celulares de distintas patologías, también se han podido derivar células germinales que en teoría podrían servir para producir seres humanos vivos

Kee K, et al. Nature 2009; 462: 222-225

Editorial. Nature 2008; 452:913

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

Pero las experiencias más excitantes en este terreno han sido realizadas por dos grupo de investigadores chinos que han logrado producir ratones vivos a partir de células iPS

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

El primero de ellos lo consiguió a partir de la producción de blastocistos tetraploides a los que se habían previamente transferido las células iPS

Kang L, et al. Cell Stem Cell 2009; 5: 135-138

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

Pero más interesante aun han sido las experiencias de Zhao y col que han logrado producir 31 ratones vivos a partir de 37 líneas de células iPS generadas de fibroblastos de piel. La técnica utilizada ha sido similar a la de Kang por medio de la cual tras inyectar las células iPS en blastocistos normales estos fueron transferidos a hembras que quedaron preñadas. Los ratones generados tenían entre un 5% a 80% de quimerismo.

Pero lo más interesante de estas experiencias es que a partir de los ratones producidos se pudo producir una segunda generación de ratones vivos que tenían las características genéticas del ratón del cual se habían derivado las células iPS

Zhao X, et al. Nature 2009; 461:86-90

POSIBILIDAD DE PRODUCIR SERES VIVOS A PARTIR DE CELULAS IPS

El último grupo en conseguir animales vivos a partir de células iPS ha sido el de Boland y col que utilizando una técnica similar a la de Zhao, han logrado también que los embriones generados tuvieran características genéticas similares a la de los ratones de los que se habían derivado las células iPS

Boland M, et al. Nature 2009; 461 91-94

BREVE CONSIDERACIÓN ETICA

BREVE CONSIDERACIÓN ETICA

No cabe duda que una de las características más positivas de las células iPS es que no se requiere utilizar células madre embrionarias para obtenerlas

Sin embargo, al poder derivar de ellas, animales vivos, se abre la posibilidad de poder clonar seres humanos sin tener que recurrir a la transferencia nuclear somática

BREVE CONSIDERACIÓN ETICA

Esto presupone que la responsabilidad ética ultima del uso de las células iPs queda en mano de los propios investigadores, firmas comerciales y la sociedad en general

MOTIVACIÓN ÉTICA DE LAS EXPERIENCIAS DE YAMANAKA

MOTIVACIÓN ÉTICA DE YAMANAKA PARA SUS INVESTIGACIONES

- **“Cuando vi el embrión, rápidamente me di cuenta de que no había diferencia entre él y mis hijas”**
- **“Pensé que no podemos permitirnos destruir embriones para nuestras investigaciones”**
- **“Tiene que haber otro camino”**

M Fackler “The New York Times” 11-XI-2007

